

اثر مهارکنندگی کارواکروول بر بیان ژن اختصاصی ریس (HWP1) کاندیدا آلیکانس

علیرضا خداوندی (PhD)^۱، فهیمه علیزاده (PhD)^۲، شهره زابلی زاده (MSc)^۲

۱- گروه زیست شناسی، واحد گچساران، دانشگاه آزاد اسلامی، گچساران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران

دریافت: ۹۷/۱/۱۵ اصلاح: ۹۷/۶/۱۴ پذیرش: ۹۷/۶/۱۷

خلاصه

سابقه و هدف: عفونت ناشی از کاندیدا آلیکانس مشکل عدیده و رو به افزایش در بالین و به ویژه در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر مهاری کارواکروول بر تشکیل ریس و بیان ژن HWP1 کاندیدا آلیکانس انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی بر روی نمونه های سوآب واژن، دهان و سطوح پوست از بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی انجام گردید. جدایه های کلونیزه کاندیدا آلیکانس حساس به دارو با استفاده از نرم افزار WHONET شناسایی شدند. آزمون حساسیت سنجی برای کارواکروول (محدوده رقت ۶/۲۵-۳۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) با استفاده از روش میکرودايلوشن برات (CLSI) علیه جدایه های حساس کاندیدا آلیکانس تعیین شد. سنجش زمان مرگ سلولی کارواکروول (محدوده رقت دو برابر MIC تا یک چهارم MIC) انجام گردید. ممانعت از تشکیل ریس به استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. با استفاده از RT-PCR کمی میزان بیان ژن HWP1 در کاندیدا آلیکانس ATCC 14053 تعیین گردید.

یافته ها: ده جدایه بالینی کلونیزه کاندیدا آلیکانس حساس به دارو شناسایی گردید. کارواکروول با محدوده MIC ۲۵-۲۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر موجب مهار رشد جدایه های حساس به دارو کاندیدا آلیکانس شد. نتایج سنجش زمان مرگ سلولی تاثیر مهاری معنی دار کارواکروول را در رشد کاندیدا آلیکانس نشان داد ($p \leq 0.05$). کاهش معنی دار تبدیل سلول های مخمری به ریس وجود داشت. در جدایه های حساس به دارو کاندیدا آلیکانس، کارواکروول ممانعت از تشکیل ریس نمود. بیان ژن HWP1 در رقت های معادل دو برابر MIC و برابر MIC کارواکروول به ترتیب $1/82 \pm 0/20$ و $1/62 \pm 0/07$ برابر کاهش پیدا کرد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه اثباتی برای رویکرد بالینی ایمن و بهبود یافته ای از کارواکروول در درمان عفونت های ناشی از کاندیدا و مهار تشکیل ریس توسط آن ارائه می دهد.

واژه های کلیدی: کاندیدا آلیکانس، بیان ژن، ریس.

مقدمه

تبدیل فرم مخمری به ریس ای نه تنها با سایر فاکتورهای بیماریزایی مانند ترشح هیدرولازها تقویت می شود، بلکه برای انتشار قارچ در بخش های مختلف بدن میزبان نیز ضروری است. کاندیدا آلیکانس یک عامل بیماریزای چند شکلی با توانایی تبدیل فرم مخمری به ریس ای است. سلول های رشته ای ریس مقاومت به فاگوسیتوز را با واسطه سلول های میزبان افزایش داده و سبب بهبود اتصال به سطوح سلول میزبان با توانایی حمله به سلول های اپی تلیال می شوند. اتصال منجر به کلونیزاسیون، تولید لوله زایا، طویل شدن رشته ها و مشارکت در انتشار درون بافت ها شده و سبب آسیب های بافتی می گردد (۴-۱). تهاجم به بافت میزبان از طریق بیان مولکول اتصال به سطح سلول صورت می گیرد. واکنش های اختصاصی و غیراختصاصی امکان اتصال کاندیدا آلیکانس به طیف وسیعی از بافت ها را از طریق

پروتئین اختصاصی اتصال فراهم می کنند. مولکول های مهم اتصال عبارتند از پروتئین های توالی مشابه آگلوتنین (ALS) و پروتئین دیواره سلولی ریس (Hwp1). توالی N-ترمینال Hwp1 سوبسترای برای آنزیم های ترانس گلوآمیناز پستانداران است و سبب القای تشکیل یک پیوند میان ریس کاندیدا آلیکانس و سلول های میزبان می شود. هرچند گونه های کاندیدا اعضای همزیست میکروبیوتای طبیعی انسان هستند، اما اختلالات موضعی و متناوب در محل های مخاطی می تواند به عفونت های ناشی از رشد بیش از حد کاندیدا کمک کند (۳و۲). شواهد نشان می دهد که الگوی بیان ژن HWP1 در بیماریزایی کاندیدا آلیکانس با سایر عوامل بیماریزایی مخمر و تعدادی از عوامل خطر میزبان مرتبط است (۷و۶). داروهای ضدقارچی مهم بالینی شامل پلی آن ها، آزول ها، اکتینوکاندین ها، ۵-

این مقاله حاصل پایان نامه شهره زابلی زاده دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر فهیمه علیزاده

آدرس: یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۰۷۴-۳۳۳۱۳۹۳۰

E-mail: mnalizadeh@yahoo.com

شدند. محلول‌های استوک کارواکرول، آمفوتریسین بی، فلوکونازول، کتوکونازول و میکونازول (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) در حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه شدند.

سنجش‌های حساسیت: صد میکرولیتر از سوسپانسیون‌های *کاندیدا آلبیکانس* ($10^6 \times 5-1$ CFU/ml) بر روی SDA پخش شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین بی (۱۰ میکروگرم)، فلوکونازول (۱۵ میکروگرم)، کتوکونازول (۱۵ میکروگرم) و میکونازول (۱۰ میکروگرم) (Rosco, Denmark) بر روی سطح آگار قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۵ درجه سلیسیوس، قطر هاله‌های مانع از رشد مشاهده شده در اطراف دیسک بر اساس میلی‌متر گزارش شد. کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) برای سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از آزمون سنجش حساسیت ضدقارچی میکرودایلوشن برات مطابق با دستورالعمل‌های CSLI M27-A3 و M27-S4 تعیین شد. رقت‌های متوالی دو برابر از هر عوامل ضدقارچی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ال-گلوتامین (Sigma-Aldrich) که توسط مورفولینو پروپان سولفونیک اسید (MOPS) ۰/۱۶۵ مولار با اسیدیته ۷ تنظیم شده، تهیه گردید و به میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی (Moheb Qazvin, Iran) اضافه شد.

سوسپانسیون جدایه‌های بالینی *کاندیدا آلبیکانس* مورد بررسی با تراکم سلولی $10^3 \times 2-5$ CFU/ml در محیط کشت RPMI-1640 تهیه شد و به چاهک‌های مورد بررسی حاوی عوامل ضدقارچی اضافه گردید. کنترل‌های بدون دارو و بدون مخمر به ترتیب به عنوان کنترل‌های رشد و استریل‌تهیه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شد و توسط الیزا ریدر (Stat Fax 303 Awareness Technology, Inc., USA) در طول موج ۵۳۰ نانومتر میزان جذب نوری چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. کمترین غلظت هر ترکیب ضدقارچی که از ۵۰ و ۹۰ درصد رشد در مقایسه با کنترل ممانعت نماید، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۲۲).

سنجش زمان مرگ سلولی: سنجش زمان مرگ سلولی مطابق روش ذکر شده در مطالعات دیگر انجام گرفت (۲۳). سوسپانسیون‌های سلولی *کاندیدا آلبیکانس*، $10^6 \times 1-5$ سلول/ میلی لیتر در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید و غلظت‌های مختلف کارواکرول (دو برابر MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC) به آن اضافه شد. لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و در فواصل زمانی متوالی ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۲۰، ۲۴۰ و ۴۸۰ ساعت، کلنی‌های حاصل از رقت‌های متوالی ۱۰ تایی بر روی محیط کشت SDA شمارش شد.

تشکیل ریشه و تیمار: تشکیل ریشه *کاندیدا آلبیکانس* بر روی سطح کاور اسلیپ‌های پلاستیکی در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت سلولی انجام شد (۲۴). سوسپانسیون‌های سلولی *کاندیدا آلبیکانس*، $10^6 \times 1-5$ سلول/ میلی لیتر در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید و ۴ میلی لیتر به چاهک‌های حاوی ۴ میلی لیتر غلظت‌های مختلف کارواکرول (دو برابر MIC، نصف MIC و یک چهارم MIC) اضافه شد و در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. سپس تشکیل ریشه به گرمخانه‌گذاری همراه با تکان دادن در ۲۰۰ rpm در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱۶ ساعت القا گردید. در نهایت، کاور اسلیپ‌ها را با سرم فیزیولوژی شستشو داده شده و از میکروسکوپ نوری (Nikon, Japan) مشاهده شدند.

فلوروسیتوزین و میازین‌ها هستند که سنتز غشاء سلولی، دیواره سلولی، پروتئین و DNA را مهار یا مختل می‌نمایند (۸-۱۱).

غرابالگری محصولات طبیعی ابزار قدرتمندی برای شناسایی مکانیسم ضدقارچی محصولات طبیعی است که می‌تواند برای درمان‌ها عفونت‌ها مورد استفاده قرار گیرند. در طول سال‌های اخیر، مطالعات نشان داده‌اند که کارواکرول می‌تواند با هدف قرار دادن و اتصال به ارگوسترول غشایی قارچ به عنوان یک عامل مخرب غشاء عمل نماید (۱۰ و ۱۱). علاوه بر این، کارواکرول فعالیت ضدقارچی علیه *کاندیدا آلبیکانس* نشان می‌دهد (۱۷-۹). Dalleou و همکارانش تاثیر ضدقارچی کارواکرول را بر سلول‌های پلانکتونی و بیوفیلم‌های *کاندیدا آلبیکانس* نشان دادند (۱۸).

کاندیدا آلبیکانس بعنوان عامل اصلی بیماری انسانی ظهور کرده و سبب بروز عفونت‌های سطحی تا کاندیدیازیس تهاجمی عمیق، مخصوصاً در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی می‌گردد (۲۰ و ۱۹). هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدقارچی کارواکرول علیه *کاندیدا آلبیکانس* حساس به دارو می‌باشد. بویژه، تاثیر مهارتی کارواکرول با استفاده از سنجش زمان مرگ سلول، تشکیل ریشه و پروفایل بیان ژن *کاندیدا آلبیکانس* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم‌ها، ترکیبات و محیط کشت‌ها: مطالعه مقطعی در یک بازه زمانی ۶ ماهه، نمونه‌های سواب واژن، دهان و سطوح پوست ۶۰ بیمار مبتلا به ضعف سیستم ایمنی (بیماران دیابتی، سرطانی و تحت همودیلیز) مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید بهشتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ایران جمع‌آوری گردید. بیماران مبتلا به عفونت کاندیدیازیس از مطالعه خارج شدند. نمونه‌های بالینی با رضایت بیماران جمع‌آوری شده و سریع به آزمایشگاه میکروبیشناسی دانشگاه آزاد اسلامی یاسوج، ایران، انتقال یافتند. مطالعه حاضر در کمیته اخلاق پژوهشی با کد IR.IAU.YASOOJ.REC.1395.21 به تصویب رسید. (پروتکل مطالعه به تایید دستورالعمل‌های اخلاقی هلینسکی در سال ۲۰۰۸ رسید).

نمونه‌های بالینی بر روی سابورو دکستروز آگار (SDA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan) کشت داده و در ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. جدایه‌های کلونیزه *کاندیدا آلبیکانس* با روش‌های مرفولوژی میکروسکوپی و ماکروسکوپی، تشکیل لوله زایا، کشت بر روی محیط کشت کرم آگار *کاندیدا* (CHROMagar Company, France)، تخمیر و جذب کربوهیدرات‌ها، هیدرولیز اوره و روش‌های جداسازی بر پایه PCR با استفاده از پرایمرهای قارچی عمومی (ITS1 و ITS4) شناسایی شدند.

سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکانس* ATCC 14053 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. برای تعیین حساسیت *کاندیدا آلبیکانس* به آمفوتریسین بی، فلوکونازول، کتوکونازول و میکونازول، نتایج حاصل از آزمون‌های سنجش حساسیت موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CSLI) انتشار دیسک (M44-A2) و میکرودایلوشن برات (M-27-A3 و M27-S4) با استفاده از نرم‌افزار WHONET آنالیز شدند (۲۱ و ۲۲). به منظور آماده‌سازی سوسپانسیون‌های *کاندیدا آلبیکانس*، همه جدایه‌های کلونیزه *کاندیدا آلبیکانس* در SDA کشت داده

گرفت. از ژن بتا-کتین برای نرمال کردن و آنالیز تغییرات نسبی در بیان ژن هدف استفاده شد. میزان بیان ژن از مقادیر نسبی بدست آمده از نرم افزار Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad, USA, version 4.6) بر اساس میزان تغییر در بیان ژن هدف=میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس در نمونه های مورد بررسی/میزان بیان ژن هدف/میزان بیان ژن رفرنس در نمونه کنترل بدون تیمار، به دست آمده است. محصولات PCR با استفاده از کیت استخراج (Qiagen, USA) QIAquick Gel (Qiagen, USA) تخلیص شده و با تعیین توالی DNA (First BASE Laboratories Sdn. Bhd., Malaysia) تایید شدند (۲۳و۲۴).

آنالیزهای آماری: نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار سه تکرار ارائه شده است. آنالیز آماری با استفاده از آزمون یک طرفه ANOVA انجام شد. مقایسه دو میانگین با آزمون تعقیبی توکی محاسبه گردید و $p \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

پرایمر	سکونس	منبع
<i>HWPI</i> -F	5' GGTAGACGGTCAAGGTGAAACA 3'	(۲۴)
<i>HWPI</i> -R	5' AGGTGGATTGTCGCAAGGTT 3'	(۲۴)
<i>ACT</i> -F	5' ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC 3'	(۲۴)
<i>ACT</i> -R	5' GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA 3'	(۲۴)

MIC کارواکرول در محدوده ۲۰۰-۲۵ میکروگرم/ میلی لیتر بود؛ رشد جدایه های حساس به داروی کاندیدا/آلبیکاناس مهار شده بود. \log_{10} CFU پس از گذشت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت از گرمخانه گذاری در مقایسه با کنترل تیمار نشده کاهش یافته بود ($p \leq 0.05$). پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، مقدار \log_{10} CFU در کاندیدا/آلبیکاناس ATCC 14403 تیمار شده با غلظت های معادل دو برابر MIC، نصف MIC، و یک چهارم MIC از کارواکرول به ترتیب ۶/۴۸، ۵/۸۲ و ۶/۴۸ برابر کاهش یافته بود. علاوه براین، در جدایه های حساس به دارو تیمار شده با غلظت های دو برابر MIC، نصف MIC، و یک چهارم MIC کارواکرول، جمعیت قارچی به ترتیب ۷/۱۳، ۶/۰۸ و ۴/۵۴ برابر کشته شدند (شکل ۱).

تاثیر کارواکرول بر ریشه کاندیدا/آلبیکاناس با مشاهدات میکروسکوپ نوری تایید شد. برای نمونه های کنترل تیمار نشده، ریشه های کاندیدا/آلبیکاناس تشکیل شده بر روی کاور اسلیپ شامل سلول های رشته ای و کلنی های پراکنده بودند. ریشه های تیمار شده با کارواکرول از نظر تعداد و تراکم سلول های رشته ای و کلنی های پراکنده بسته به غلظت کارواکرول کاهش یافته بودند. در مقایسه با نمونه های کنترل تیمار نشده، هیچ سلول رشته ای در کشت کاندیدا/آلبیکاناس تیمار شده با غلظت دو برابر MIC کارواکرول مشاهده نشد و کلنی های پراکنده ای که اکثرا از سلول های مخمری تشکیل شدند، با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند (شکل ۲). میزان بیان ژن اختصاصی ریشه، *HWPI* در تیمار با کارواکرول ضمن تشکیل ریشه مهار شد ($p \leq 0.001$) (شکل ۳). در سلول های کاندیدا/آلبیکاناس تیمار شده با کارواکرول، میزان بیان ژن *HWPI* از غلظت های معادل دو برابر MIC و برابر MIC به ترتیب 0.7 ± 1.82 و 0.07 ± 1.62 برابر کاهش پیدا کرد.

سنجش کمی نسبی بیان ژن: ریشه های کاندیدا/آلبیکاناس (ATCC 14053) در فقدان یا حضور غلظت های مختلف کارواکرول (دو برابر MIC و برابر MIC) در پلیت های ۶ چاهکی کشت سلولی همانند روش ذکر شده در بخش قبلی تشکیل گردید.

سلول های ریشه از پلیت ها جمع آوری شده و RNA کل آنها با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) مطابق دستورالعمل سازنده استخراج شد. ۵/۰ میکروگرم از نمونه RNA با آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Fermentas, USA) نسخه برداری معکوس شد. پرایمرها برای بیان ژن اختصاصی ریشه (*HWPI*) گرفته شد (جدول ۱). فرآیند PCR از مراحل واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۲۶ چرخه تکثیر (۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۶ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه) و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در یک ترموسایکلر Tpersonal (Biometra- Germany) صورت

یافته ها

از ۶۰ نمونه بالینی جمع آوری شده ۲۰ کاندیدا/آلبیکاناس شناسایی شد. صحت جدایه های کاندیدا/آلبیکاناس فنوتیپی و با استفاده از توالی DNA تایید شد. با استفاده از نرم افزار WHONET، از ۲۰ جدایه کاندیدا/آلبیکاناس، ۱۰ جدایه حساس به دارو شناسایی گردید. جدول های ۲ و ۳ خلاصه نتایج سنجش حساسیت آزمایشگاهی داروهای ضدقارچی علیه کاندیدا/آلبیکاناس با استفاده از آزمون های استاندارد CLSI دیسک دیفیوژن و میکروداپلوشن براث نشان داده شده است. ضریب کاپا نشان داد که نتایج آزمون های سنجش حساسیت ضدقارچی دیسک دیفیوژن و میکروداپلوشن براث داروهای آمفوتریسین بی، فلوکونازول، کنوکونازول و میکونازول توافق زیادی وجود دارد.

جدول ۲. نتایج سنجش حساسیت ضدقارچی جدایه های بالینی کاندیدا/آلبیکاناس

نام آنتی بیوتیک	کد	گروه آنتی بیوتیک	درصد مقومت	درصد حدواسط	درصد حساسیت
آمفوتریسین بی	AMB	ضدقارچی	۴۵	-	۵۵
فلوکونازول	FLU	ضدقارچی	۵۰	-	۵۰
کنوکونازول	KET	ضدقارچی	۵۰	-	۵۰
میکونازول	MIC	ضدقارچی	۵۰	-	۵۰

کارواکرول فعالیت ضدقارچی معنی داری علیه کاندیدا/آلبیکاناس حساس به دارو نشان داد و MIC آنها با MIC بدست آمده از فلوکونازول قابل مقایسه بود. عامل ضدقارچ فلوکونازول به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (جدول ۴).

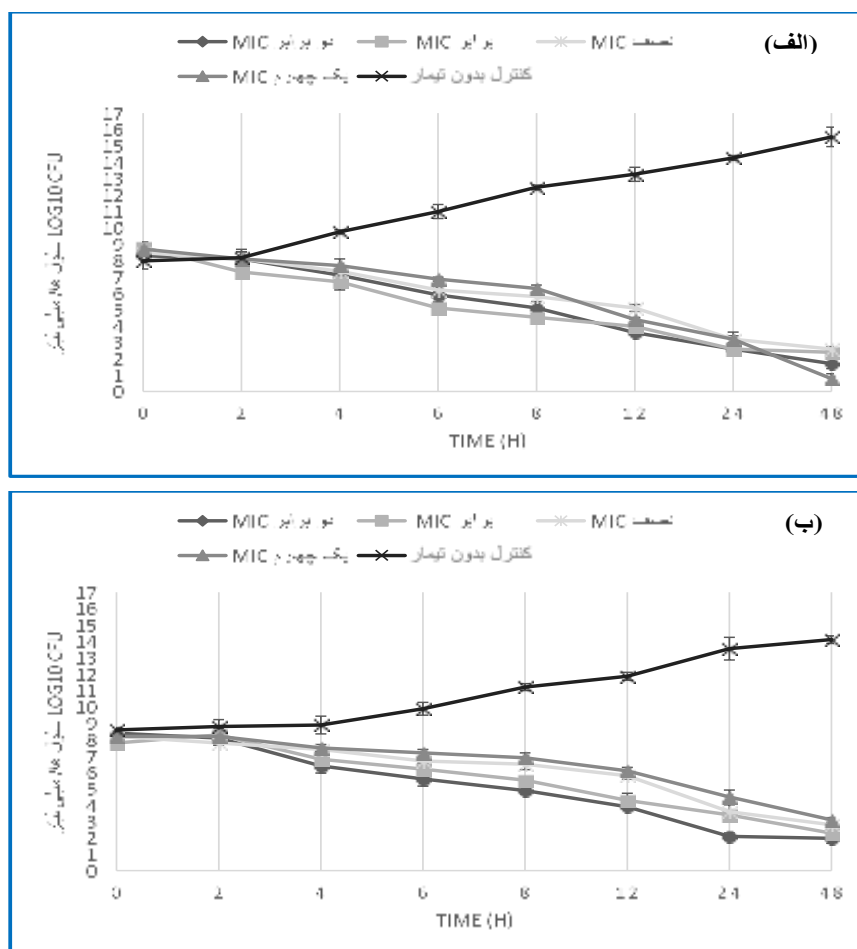
جدول ۳. نتایج سنجش حساسیت ضدقارچی علیه جدایه های بالینی *کاندیدا آلبیکانس* با استفاده از روش های دیسک دیفیوژن و میکرودايلوشن برات

جدایه ها/ ضدقارچ ها	آمفوتریسین بی		فلوکونازول		کتوکونازول		میکونازول	
	قطر دیسک*	MIC ₉₀ **	قطر دیسک*	MIC ₉₀ **	قطر دیسک*	MIC ₉₀ **	قطر دیسک*	MIC ₉₀ **
<i>کاندیدا آلبیکانس</i> ATCC 14053	۱۹/۰۰±۰/۰۴	۰/۰۳	۲۲/۰۰±۰/۱۰	۰/۱۲۵	۳۰/۰۰±۰/۰۴	۰/۰۶	۲۲/۰۰±۰/۰۸	۲
جدایه ۱	۹/۵۰±۰/۲۰	۱	۱۲/۰۰±۰/۱۰	۱۶	۱۹/۵۰±۰/۲۰	۱	۸/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۲	۱۴/۷۰±۰/۰۶	۰/۵	۱۸/۷۰±۰/۱۰	۴	۲۴/۰۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۲۱/۷۰±۰/۰۶	۲
جدایه ۳	۱۶/۰۰±۰/۱۰	۰/۵	۲۱/۰۰±۰/۰۱	۴	۲۵/۷۰±۰/۰۶	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۲
جدایه ۴	۱۲/۰۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۱۸/۰۰±۰/۰۳	۲	۲۵/۷۰±۰/۱۰	۰/۰۳	۱۸/۰۰±۰/۱۰	۲
جدایه ۵	۱۷/۰۰±۰/۱۰	۰/۵	۱۵/۷۰±۰/۰۲	۴	۲۴/۰۰±۰/۱۰	۰/۱۲۵	۲۰/۳۰±۰/۰۶	۱
جدایه ۶	۱۵/۱۰±۰/۱۰	۱	۱۱/۰۰±۰/۰۳	۱۶	۱۸/۵۰±۰/۰۴	۱	۱۰/۰۰±۰/۰۸	۸
جدایه ۷	۱۵/۷۰±۰/۰۶	۱	۱۶/۰۰±۰/۱۰	۴	۲۸/۰۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۲
جدایه ۸	۱۴/۳۰±۰/۰۶	۱	۱۸/۰۰±۰/۰۲	۴	۳۱/۰۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۱
جدایه ۹	۸/۱۰±۰/۰۱	۴	۱۱/۰۰±۰/۰۵	۳۲	۱۷/۵۰±۰/۲۰	۰/۵	۱۰/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۱۰	۱۱/۷۰±۰/۰۶	۰/۵	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۴	۳۰/۳۰±۰/۰۶	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۱
جدایه ۱۱	۱۴/۳۰±۰/۰۶	۱	۱۹/۷۰±۰/۱۰	۲	۲۵/۵۰±۰/۱۰	۰/۰۶	۲۰/۰۰±۰/۱۰	۲
جدایه ۱۲	۱۲/۰۰±۰/۱۰	۱	۲۱/۷۰±۰/۰۳	۲	۲۵/۵۰±۰/۱۰	۰/۱۲۵	۱۷/۰۰±۰/۰۶	۲
جدایه ۱۳	۱۶/۰۰±۰/۱۰	۱	۱۶/۸۰±۰/۰۴	۱	۲۶/۶۰±۰/۱۰	۰/۰۳	۱۹/۷۰±۰/۰۶	۲
جدایه ۱۴	۸/۶۰±۰/۰۱	۴	۹/۰۰±۰/۰۳	۱۶	۱۸/۵۰±۰/۰۴	۱	۹/۰۰±۰/۰۸	۸
جدایه ۱۵	۹/۵۰±۰/۰۵	۴	۱۰/۰۰±۰/۰۷	۱۶	۱۹/۵۰±۰/۲۰	۱	۱۱/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۱۶	۸/۵۰±۰/۰۱	۴	۱۰/۰۰±۰/۱۰	۱۶	۱۸/۵۰±۰/۰۴	۱	۱۰/۰۰±۰/۰۸	۸
جدایه ۱۷	۸/۰۰±۰/۰۱	۸	۱۱/۰۰±۰/۰۵	۳۲	۱۷/۵۰±۰/۲۰	۰/۵	۱۰/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۱۸	۸/۵۰±۰/۰۱	۸	۹/۰۰±۰/۰۴	۱۶	۱۹/۵۰±۰/۰۴	۱	۹/۰۰±۰/۰۸	۸
جدایه ۱۹	۸/۵۰±۰/۰۱	۴	۱۰/۰۰±۰/۰۳	۱۶	۱۷/۵۰±۰/۲۰	۱	۱۰/۰۰±۰/۱۰	۸
جدایه ۲۰	۹/۰۰±۰/۰۲	۴	۹/۰۰±۰/۱۰	۶۴	۱۸/۵۰±۰/۰۴	۱	۱۰/۰۰±۰/۰۸	۸

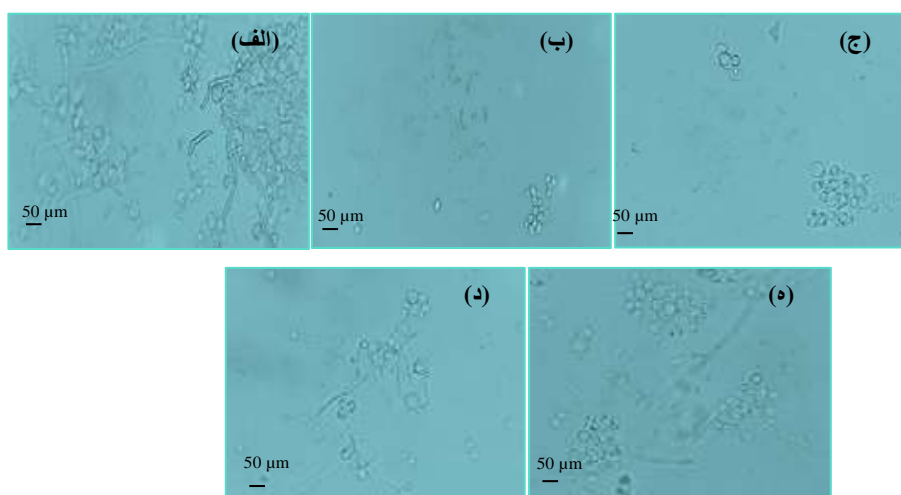
* (میلی متر)، ** (میکروگرم/ میلی لیتر)

جدول ۴. میزان MIC (میکروگرم/ میلی لیتر) کارواکترول علیه جدایه های بالینی حساس به داروی *کاندیدا آلبیکانس*

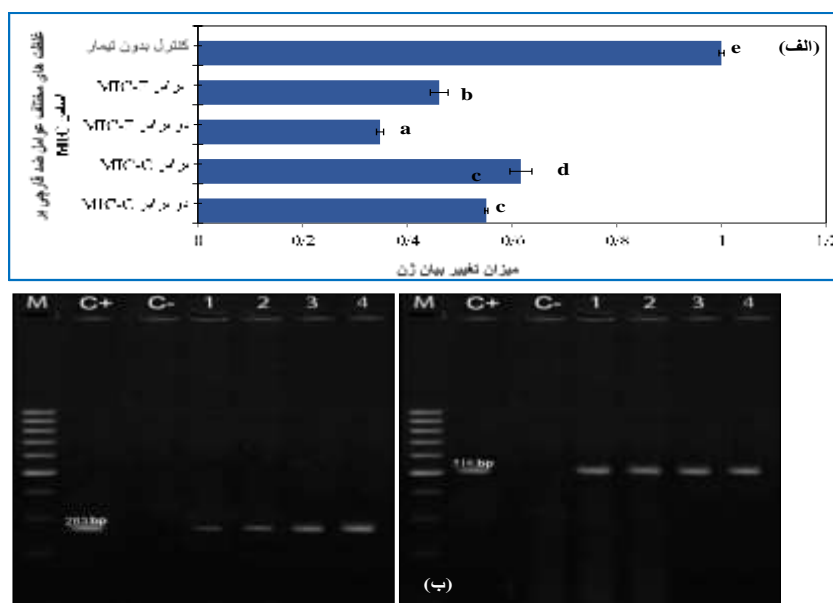
جدایه ها/ ضدقارچ ها	کارواکترول		فلوکونازول	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
<i>کاندیدا آلبیکانس</i> ATCC 14053	۲۵	۱۲/۵	۰/۱۲۵	۰/۰۳
جدایه ۲	۱۰۰	۵۰	۴	۲
جدایه ۳	۲۵	۱۲/۵	۴	۲
جدایه ۴	۲۰۰	۱۰۰	۲	۱
جدایه ۵	۱۰۰	۵۰	۴	۲
جدایه ۷	۱۰۰	۵۰	۴	۲
جدایه ۸	۱۰۰	۵۰	۴	۲
جدایه ۱۰	۵۰	۲۵	۴	۲
جدایه ۱۱	۱۰۰	۵۰	۲	۱
جدایه ۱۲	۱۰۰	۵۰	۲	۱
جدایه ۱۳	۵۰	۲۵	۱	۰/۵



شکل ۱. تاثیر کارواکرول در غلظت های محدوده دو برابر MIC تا یک چهارم MIC بر منحنی زمان مرگ سلول. الف) کاندیدا آلبیکانس ATCC 14053 و ب) جدایه حساس به داروی کاندیدا آلبیکانس. داده ها میانگین \pm انحراف معیار سه اندازه گیری است



شکل ۲. نمونه تصاویر میکروسکوپ نوری نشان دهنده تشکیل ریشه توسط کاندیدا آلبیکانس ATCC 14053 تیمار شده با غلظت های مختلف کارواکرول بعد از ۱۶ ساعت گرمخانه گذاری است. الف: کنترل بدون تیمار، مرفولوژی شامل سلول های رشته ای و مخمری است. ب: تیمار شده با دو برابر MIC از کارواکرول، سلول های رشته ای کاملاً از بین رفته اند. ج: تیمار شده با غلظت برابر MIC کارواکرول، اختلال در تشکیل ریشه ایجاد شده، اکثراً سلول های مخمری مشاهده شد. د: تیمار شده با غلظت نصف MIC کارواکرول، کاهش سلول های رشته ای و مخمری مشاهده گردید. د: تیمار شده با غلظت یک چهارم MIC کارواکرول، تعداد بسیار کمتر سلول های رشته ای و مخمری مشاهده شد. بزرگنمایی $40\times$. Bar = 50 μm



شکل ۳. آنالیز کمی RT-PCR ژن اختصاصی ریسه (*HWPI*) *کاندیدا/آلیکانس* ATCC 14053 در حضور یا عدم حضور کارواکرول (C) و فلوکونازول (F) در غلظت های دو برابر MIC برابر MIC. داده ها میانگین \pm انحراف معیار سه اندازه گیری است. میانگین با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در $p < 0.05$ است. ب و ج به ترتیب بیان ژن *HWPI* و بتا اکتین در *کاندیدا/آلیکانس* ATCC 14053 تیمار شده با غلظت های مختلف کارواکرول با استفاده از RT-PCR کمی هست. M: مارکر Ca^{2+} DNA، Ca^{2+} و یا اکتین بدون کارواکرول (کنترل بدون تیمار)، C-: کنترل منفی PCR، ۱: تیمار شده با غلظت دو برابر MIC فلوکونازول، ۲: تیمار شده با غلظت برابر MIC فلوکونازول، ۳: تیمار شده با غلظت دو برابر MIC کارواکرول، ۴: تیمار شده با غلظت برابر MIC کارواکرول

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، کارواکرول سبب مهار کارآمد تولید ریسه های *کاندیدا/آلیکانس* شده است. مطالعات، تاثیرات کارواکرول علیه سلول های پلانکتونی و بیوفیلم های *کاندیدا/آلیکانس* را نشان داده اند (۱۸ و ۲۵). فعالیت ضدقارچی کارواکرول را می توان به تنش Ca^{2+} و مهار مسیر TOR (هدف راپاماسین) نسبت داد. یافته های مطالعه حاضر با سنجش زمان مرگ و تشکیل ریسه سلول های تیمار شده با کارواکرول تایید شدند که یک کاهش معنی دار در تعداد سلول ها نشان دادند. این کاهش سلول های رشته ای و مخمری به احتمال زیاد بدلیل نفوذ کارواکرول به سلول ها و کاهش تعداد سلول ها با تاثیر مهاری تبدیل فرم مخمری به ریسه است. کارواکرول می تواند با فعال سازی مسیرهای پیام رسانی اختصاصی، یکپارچگی غشاء را مختل، مسیرهای سنتز ارگوسترول را مسدود و در نتیجه سبب آسیب به سیستم های آنزیمی سلولی مانند سیستم های مرتبط با تولید انرژی و سنتز ترکیبات ساختاری شود (۲۸-۱۲). علاوه بر این، نتایج فوق با تغییرات میزان بیان ژن ریسه سلول های *کاندیدا/آلیکانس* تیمار شده را با کارواکرول پشتیبانی شد. میزان بیان ژن اختصاصی *HWPI* به عنوان شاخصی از تشکیل ریسه در سلول های *کاندیدا/آلیکانس* با

روش RT-PCR تعیین شد. نتایج حاضر با سایر تحقیقات انجام شده که تغییر میزان بیان ژن *HWPI* در ریسه *کاندیدا/آلیکانس* تیمار شده با عوامل ضدقارچی بررسی کرده اند، نیز تایید گردید (۳۰ و ۲۹ و ۲۴). در مطالعه حاضر نشان داده شد که کارواکرول مانع از تشکیل ریسه در *کاندیدا/آلیکانس* حساس به دارو می گردد. علاوه بر این، کارواکرول کاهش سلول های رشته ای و مخمری و تاثیر مهاری بر بیان ژن *HWPI* را نشان داد. این نتایج نشان دادند که کارواکرول می تواند یک رویکرد بالینی امن و پیشرفته را در درمان عفونت های *کاندیدا* ارائه دهد. از آنجاکه عفونت های حاصل از *کاندیدا/آلیکانس* مقاوم به دارو مشکلات سلامتی جدی هستند، تحقیقات آینده می توانند به بررسی تاثیر کارواکرول علیه عفونت های مقاوم به درمان های رایج بپردازند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی یاسوج جهت حمایت مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می گردد.

Inhibitory Effect of Carvacrol on the Expression of *Candida albicans* Hyphae-Specific Gene (*HWPI*)

A. Khodavandi (PhD)¹, F. Alizadeh (PhD)^{2*}, S. Zaboli zadeh (MSc)²

1. Department of Biology, Gachsaran Branch, Islamic Azad University, Gachsaran, I.R.Iran

2. Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(10); Oct 2018; PP: 7-13

Received: Apr 4th 2018, Revised: Sep 5th 2018, Accepted: Sep 8th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Candida albicans* infection is a problem of growing clinical importance, particularly in immunocompromised populations. This study aimed to investigate the inhibitory effect of carvacrol on the hyphae formation and expression of *C. albicans* *HWPI*.

METHODS: This cross-sectional study was done over a 6-month period in 2016-2017. Vaginal, mouth and skin surface swabs were obtained from immunocompromised patients. Colonizing clinical isolates of *C. albicans* were identified and drug susceptible isolates detected using WHONET software. The susceptibility test for carvacrol (range 6.25–300 µg/ml) were carried out with a broth microdilution according to the CLSI guidelines against drug susceptible *C. albicans*. The time kill assay of carvacrol (range $2 \times \text{MIC}$ to $\frac{1}{4} \times \text{MIC}$) was determined. Hyphae inhibition was evaluated by light microscopy. We determined the expression levels of *HWPI* implicated in hyphae formation of *C. albicans* ATCC 14053 cells by quantitative RT-PCR.

FINDINGS: Ten colonizing clinical isolates of drug susceptible *C. albicans* were identified. Carvacrol was inhibited the growth of all drugs susceptible isolates of *C. albicans* (MIC range, 25-200 µg/ml). Time kill curve assay demonstrated that carvacrol could significantly inhibit the growth of *C. albicans* ($p \leq 0.05$). Carvacrol efficiently prevented hyphae formation in drug susceptible *C. albicans*. The expression levels of *HWPI* gene were down-regulated by 1.82- and 1.62-fold at concentrations of $2 \times \text{MIC}$ and $1 \times \text{MIC}$ of carvacrol, respectively.

CONCLUSION: These results suggest that carvacrol could provide an improved and safe clinical approach in treating *Candida* infections by prevention of hyphae formation.

KEY WORDS: *Candida albicans*, Gene Expression, Hyphae.

Please cite this article as follows:

Khodavandi A, Alizadeh F, Zaboli zadeh S. Inhibitory Effect of Carvacrol on the Expression of *Candida albicans* Hyphae-Specific Gene (*HWPI*). J Babol Univ Med Sci. 2018;20(10):63-71.

*Corresponding Author: F. Alizadeh (PhD)

Address: Department of Microbiology, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, I.R.Iran

Tel: +98 74 33313930

E-mail: mnalizadeh@yahoo.com

References

- Chevalier M, Medioni E, Prêcheur I. Inhibition of *Candida albicans* yeast–hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. *J Med Microbiol*. 2012; 61(Pt 7): 1016-22.
- Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. albicans* virulence and omics approaches on host–pathogen interaction: a review. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(10): Pii: E1643.
- Alizadeh F, Khodavandi A, Faraji F. *Malva sylvestris* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. *J HerbMed Pharmacol*. 2017; 6(2): 62-8.
- Misme-Aucouturier B, Albassier M, Alvarez-Rueda N, Le Pape P. Specific human and *Candida* cellular interactions lead to controlled or persistent infection outcomes during granuloma-like formation. *Infect Immun*. 2017; 85(1): e00807-16.
- Richardson JP, Ho J, Naglik JR. *Candida*–epithelial interactions. *J Fungi(Basel)*. 2018; 4(1): Pii:E22.
- Kim S, Nguyen QB, Wolyniak MJ, Frechette G, Lehman CR, Fox BK, et al. Release of transcriptional repression through the HCR promoter region confers uniform expression of *HWPI* on surfaces of *Candida albicans* germ tubes. *PLoS One*. 2018; 13(2): e0192260.
- Azadmanesh J, Gowen AM, Creger PE, Schafer ND, Blankenship JR. Filamentation involves two overlapping, but distinct, programs of filamentation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *G3 (Bethesda)*. 2017; 7(11): 3797-808.
- Li X, Hou Y, Yue L, Liu S, Duc J, Sun S. Potential targets for antifungal drug discovery based on growth and virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(10): 5885-91.
- Mazu TK, Bricker BA, Flores-Rozas H, Ablordeppey SY. The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. *Mini Rev Med Chem*. 2016; 16(7): 555-78.
- Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol*. 2017; 7: 2173.
- Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist*. 2017; 10: 237-45.
- Chaillot J, Tebbji F, Remmal A, Boone C, Brown GW, Bellaoui M, et al. The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(8): 4584-92.
- Alizadeh F, Khodavandi A, Esfandyari S, Nouripour-Sisakht S. Analysis of ergosterol and gene expression profiles of sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (*ERG3*) and lanosterol 14 α -demethylase (*ERG11*) in *Candida albicans* treated with carvacrol. *J Herbmed Pharmacol* 2018; 7(2): 79-87.
- Rao A, Zhang Y, Muend S, Rao R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010; 54(12): 5062-9.
- Lima IO, de Oliveira Pereira F, de Oliveira WA, Lima EO, Menezes EA, Cunha FA, et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *J Essent Oil Res*. 2013; 25(2): 138-42.
- Liu X, Ma Z, Zhang J, Yang L. Antifungal compounds against *Candida* infections from traditional Chinese medicine. *BioMed Res Int*. 2017; Article ID 4614183.
- Khodavandi A, Alizadeh F, Alizandeh E. Antifungal activity of carvacrol in combination with fluconazole or amphotericin B against *Candida albicans*. *Malays J Microbiol*. 2018; 14(5): 356-63.
- Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(6): 572-6.
- Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang YY, Cao Y, et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence* 2016; 7(5): 512-26.

20. Ashrafpour M, Ghorbani A, Sefidgar AA, Kazemi H, Moghaddamnia A, Kazemi S, et al. The Comparison of antifungal effects of methylene chloride and methanol extracts of green and black tea on *Candida albicans*. J Babol Univ Med Sci 2016; 18(5): 53-60.
21. Badiie P, Badali H, Diba K, Ghadimi Moghadam A, Hosseininassab A, Jafarian H, et al. Susceptibility pattern of *Candida albicans* isolated from Iranian patients to antifungal agents. Curr Med Mycol. 2016; 2(1): 24-9.
22. Alizadeh F, Khodavandi A, Zalakian S. Quantitation of ergosterol content and gene expression profile of *ERG11* gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*. Curr Med Mycol. 2017; 3(1): 13-19.
23. Khodavandi A, Alizadeh F, Aghai Vanda N, Karimi G, Chong PP. Possible mechanisms of the antifungal activity of fluconazole in combination with terbinafine against *Candida albicans*. Pharma Biol. 2014; 52(12): 1505-9.
24. Khodavandi A, Harmal NH, Alizadeh F, Scully OJ, Sidik SM, Othman F, et al. Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of *HWP1* gene expression. Phytomedicine. 2011; 19(1): 56-63.
25. Khodavandi A, Alizadeh F, Sanaee T. Antifungal activity of carvacrol on ergosterol synthesis in multidrug resistant *Candida albicans*. Medical J Hormozgan Univ Med Sci. 2018; 22(2): 113-21.
26. Doke SK, Raut JS, Dhawale S, Karuppayil SM. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. J Gen Appl Microbiol. 2014; 60(5): 163-8.
27. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. Crit Rev Food Sci Nutr. 2015; 55(3): 304-18.
28. Naghdi Badi H, Abdollahi M, Mehrafarin A, Ghorbanpour M, Tolyat M, Qaderi A, et al. An overview on two valuable natural and bioactive compounds, thymol and carvacrol, in medicinal plants. J Med Plants. 2017; 3(63): 1-32.
29. Ma C, Du F, Yan L, He G, He J, Wang C, et al. Potent activities of roemerine against *Candida albicans* and the underlying mechanisms. Molecules. 2015; 20(10): 17913-28.
30. VEDIYAPPAN G, ROSSIGNOL T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(5): 2096-111.